

Process for separating ribonucleic acids from a solution containing deoxyribonucleic acids

Patent number: DE3308932
Publication date: 1984-09-13
Inventor: KELLER REINHOLD DR [DE]; SCHLINGMANN
MERTEN DR [DE]
Applicant: HOECHST AG [DE]
Classification:
- **international:** C07H21/04; C07H21/02
- **european:** B01D31/00; C07H1/08; C12N15/10A3; C12Q1/68;
C12Q1/68A4
Application number: DE19833308932 19830312
Priority number(s): DE19833308932 19830312

Also published as:



EP0121778 (A1)
US4623723 (A1)
JP59173094 (A)
EP0121778 (B1)
DK94084 (L)

Abstract not available for DE3308932

Abstract of corresponding document: **US4623723**

Crude nucleic acid solutions can be selectively separated using a membrane separating process, it being possible for the high molecular weight DNA to be isolated from the retentate and the low molecular weight RNA to be isolated from the permeate. Ultrafiltration on hollow fiber membranes is preferred.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3308932 A1**

⑤① Int. Cl. 3:
C07 H 21/04
C 07 H 21/02

②① Aktenzeichen: P 33 08 932.9
②② Anmeldetag: 12. 3. 83
④③ Offenlegungstag: 13. 9. 84

DE 3308932 A1

⑦① Anmelder:
Hoechst AG, 6230 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:
Keller, Reinhold, Dr., 6232 Bad Soden, DE;
Schlingmann, Merten, Dr., 6240 Königstein, DE

⑤④ Verfahren zur Abtrennung von Ribonukleinsäuren aus einer Lösung, die Desoxyribonukleinsäuren enthält

Mit Hilfe eines Membrantrennverfahrens können Rohnukleinsäure-Lösungen selektiv aufgetrennt werden, wobei die höhermolekulare DNA aus dem Retenat und die niedermolekulare RNA aus dem Permeat isoliert werden können. Bevorzugt ist die Ultrafiltration an Hohlfaser-Membranen.

12.03.03

3308932

- 8 -

HOE 83/F 035

Patentansprüche

1. Verfahren zur Abtrennung der Desoxyribonukleinsäure von Ribonukleinsäure aus Rohnukleinsäure-Lösungen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Rohnukleinsäure-Lösung einem Membran-Trennverfahren unterwirft, wobei die Desoxyribonukleinsäure zurückgehalten wird und die Ribonukleinsäure permeiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung als Ultrafiltration mit Hohlfasermembranen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit einer Mol-Gew.-Trenngrenze von 100 000 eingesetzt wird.

3308932

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT. 2 - HOE 83/F 035

Dr.KL/mü

Verfahren zur Abtrennung von Ribonukleinsäuren aus einer
Lösung, die Desoxyribonukleinsäuren enthält

Bei der Gewinnung von Protein für die menschliche Ernährung aus mikrobiellen Zellmassen müssen die Nukleinsäuren weitgehend entfernt werden. Vorteilhaft geschieht das nach dem in der DE-PS 26 33 666 beschriebenen Verfahren, bei dem zunächst die Lipide mit einer Extraktionsmischung aus einem polaren Lösemittel, vorzugsweise Methanol, und Ammoniak entfernt werden, worauf die Nukleinsäuren mit Wasser extrahiert werden. In diesen Rohnukleinsäureextrakten liegen neben Ribonukleinsäuren, im folgenden RNA, auch Desoxyribonukleinsäuren, im folgenden DNA, vor.

5'-Ribonukleotide dienen als Ausgangsstoffe zur Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen und für Arzneimittel. Bekannt ist ihre Herstellung durch enzymatische Hydrolyse von RNA. Das hierzu verwendete Enzym 5'-Phosphodiesterase hydrolysiert jedoch neben RNA gleichzeitig auch DNA, so daß neben den gewünschten 5'-Ribonukleotiden als Nebenprodukte auch 5'-Desoxyribonukleotide entstehen. Diese Nebenprodukte sind von den 5'-Ribonukleotiden nur sehr schwierig abzutrennen. Es sind deshalb schon Verfahren zur Herstellung von reiner RNA bekannt geworden. Hierzu gehört die selektive Ausfällung von RNA durch Erhitzen und anschließende Säurebehandlung, wie es in der japanischen Patentanmeldung 78-20 493 beschrieben ist. Nach dem Verfahren der japanischen Patentanmeldung 79-55 791 erfolgt die Säurefällung von RNA in Gegenwart zweiwertiger Kationen. Bei diesen Verfahren wird also die DNA durch eine Hitze- und Säurebehandlung zersetzt. Weiterhin geht hierbei auch ein beträchtlicher Anteil der RNA verloren.

Es wurde schon ein Verfahren zur Herstellung von 5'-Ribonukleotiden vorgeschlagen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine RNA enthaltende Lösung von Rohnukleinsäuren mit

3308932

- 2 - 3 -

einer an einem polymeren Träger immobilisierten 5'-Phosphodiesterase selektiv hydrolysiert und aus dem Hydrolysat die unveränderte DNA und die 5'-Ribonukleotide durch bekannte Reinigungs- und Trennverfahren isoliert (Deutsche Patentanmeldung P 31 36 940.5).

Es wurde nun gefunden, daß man aus Rohnukleinsäurelösungen die RNA von der DNA abtrennen kann, wenn man diese Lösung einem Membrantrennverfahren unterwirft. Man macht hierbei von dem Molgewichtsunterschied zwischen der relativ hochmolekularen DNA und der relativ niedermolekularen RNA Gebrauch. Die Ausschlußgrenze der Membran wählt man nach den bekannten bzw. ermittelten Molgewichten der zu trennenden Nukleinsäuren.

15. Membrantrennprozesse sind allgemein und insbesondere in der Biotechnologie geläufig (Übersichtsartikel: H. Strathmann, Chemie-Technik 11 (1982) 813 - 819). Bevorzugt für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Ultrafiltration in Platten-, 20 Rohr-, Kapillarrohr-, Wickelmembran- und insbesondere Hohl-faserapparaten.

Als Ausgangsmaterialien dienen bevorzugt Rohnukleinsäuren aus Bakterien, in denen die RNA zur DNA üblicherweise in 25 einem Verhältnis von etwa 4 : 1 vorliegt. Wichtig ist, daß Rohnukleinsäurelösungen eingesetzt werden, bei denen die DNA nicht oder nur unwesentlich abgebaut wurde, also Ausgangslösungen, in denen der natürliche Molgewichtsunterschied zwischen DNA und RNA im wesentlichen erhalten blieb. 30 Auch in dieser Beziehung ist das aus der DE-PS 26 33 666 bekannte Verfahren vorteilhaft.

Die erfindungsgemäß erhaltenen Permeate können in bekannter Weise, beispielsweise enzymatisch, zu den 5'-Ribonukleotiden 35 abgebaut werden. Die Retenate können in gleicher Weise zu

3308932

- 8 - 4 -

den 5'-Desoxyribonukleotiden weiterverarbeitet werden, die in vielfältiger Weise Verwendung finden, beispielsweise in der Gentechnologie. In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert.

5

Beispiel 1

Eine gemäß DE-PS 26 33 451, Beispiel 2, erhaltene Bakterienmasse mit einem Nukleinsäuregehalt von 11,2 Gew.-% und einer Restfeuchte von 2 bis 4 Gew.-% wurde 30 Minuten in einem Wirbelbett bei 160°C Lufttemperatur behandelt, wobei 10 Minuten eine Produkttemperatur von 120°C eingehalten wurde. Diese thermisch nachbehandelte Zellmasse wurde dann gemäß Beispiel 1 der DE-PS 26 33 666 mit methanolischem Ammoniak extrahiert, mit Methanol gewaschen und 5 Stunden im Vakuum bei 40°C getrocknet.

Die trockene Zellmasse wurde in der 10-fachen Gewichtsmenge Wasser suspendiert und durch Rühren homogenisiert. Nach Erhöhen der Temperatur auf 55°C wurde noch 20 Minuten weitergerührt, auf 30°C abgekühlt und durch Zentrifugieren in eine feste und flüssige Phase getrennt. Das erhaltene Sediment wurde erneut mit der gleichen Menge Wasser vermischt und 10 Minuten bei 20°C gerührt. Danach wurde erneut zentrifugiert und die flüssigen Phasen vereinigt. Sie enthalten 9 g Nukleinsäuren pro Liter bei einem RNA/DNA-Verhältnis von 4 : 1.

100 l dieser Rohnukleinsäure-Lösung werden mit einem Tiefenfilter klarfiltriert und das Filtrat in ein Hohlfaser-Ultrafiltrationsgerät (Fa. Amicon, DC 50 EM, Hollow-Fiber-Patrone, Mol-Gew.-Trenngrenze von 100 000) geleitet. Die Rohnukleinsäure-Lösung wurde dabei bis auf 10 l aufkonzentriert und anschließend mit 10 l entionisiertem Wasser diafiltriert.

35

Das so erhaltene Retenat enthält die DNA mit einer Verunreinigung von weniger als 1 % RNA und das Permeat die RNA ohne DNA-Verunreinigung.

1303-33

3308932

- 4 - 5 -

Zur Isolierung der DNA bzw. RNA wird das Retenat bzw. das Permeat auf 5°C abgekühlt und der pH-Wert der Lösung mit Salzsäure auf 2,0 gestellt. Die ausgefallene DNA bzw. RNA wird abzentrifugiert und getrocknet.

5

Beispiel 2

- Man geht von einer Rohnukleinsäure-Lösung aus, die gemäß Beispiel 8 der DE-PS 26 33 666 erhalten wurde, bei der jedoch die Nukleinsäuren nur mit Wasser extrahiert wurden. Diese Rohnukleinsäure-Lösung wird auf einen Gehalt von 30 g Nukleinsäuren pro Liter aufkonzentriert. Das RNA/DNA-Verhältnis betrug 3 : 1.
- 50 1 dieser Rohnukleinsäure-Lösung wurden wie im Beispiel 1 beschrieben vorfiltriert und anschließend ultrafiltriert. Das bis auf 5 l aufkonzentrierte Retenat wurde mit 5 l entionisiertem Wasser dialysiert. Aus dem so gewaschenen Retenat wird die DNA nach Abkühlen auf 5°C durch Einstellen des pH-Wert auf 2,0 gefällt und isoliert. Analog wird die RNA aus dem Permeat gewonnen.

20